

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-035787

(43)Date of publication of application : 15.02.1991

(51)Int.Cl.

C12P 19/00
C12P 19/38
C12P 19/44
// (C12P 19/00
C12R 1:01
C12R 1:15)
(C12P 19/38
C12R 1:20)
(C12P 19/44
C12R 1:41)

(21)Application number : 01-168103

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing : 29.06.1989

(72)Inventor : ONISHI IKUMASA
YOKOZEKI KENZO

(54) PRODUCTION OF GALACTOSE TRANSITION PRODUCT

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the title product useful as proliferation factor of Bifidobacterium and medicine in high accumulation and high yield by acting a specific microorganism on a galactose donor and galactose acceptor.

CONSTITUTION: A microorganism (e.g. Rhodotorula miniata IFO 879) having ability capable of producing galactose transition product expressed by the formula (Gal)nR (Gal is galactose residue; n is 1-4; R is sugar, sugar alcohol, etc.) is acted on a galactose donor such as lactosugar and lactose acceptor such as sugar (alcohol), nucleotide, alcohol or derivative thereof to provide the aimed product.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報(A) 平3-35787

⑤ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

③ 公開 平成3年(1991)2月15日

C 12 P 19/00
 19/38
 19/44
 //(C 12 P 19/00
 C 12 R 1:01
 1:15)
 (C 12 P 19/38
 C 12 R 1:20)
 (C 12 P 19/44
 C 12 R 1:41)

8214-4B
 8214-4B
 8214-4B

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全7頁)

④ 発明の名称 ガラクトース転移生成物の製造方法

① 特 願 平1-168103

② 出 願 平1(1989)6月29日

⑦ 発 明 者 大 西 幾 正 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央
 研究所内⑦ 発 明 者 横 関 健 三 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央
 研究所内

⑦ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

明 細 書

1. 発明の名称

ガラクトース転移生成物の製造方法

2. 特許請求の範囲

1) 乳糖または α -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド等、ガラクトース供与体と糖、糖アルコール、スクレオシド、アルコール及びその誘導体等のガラクトース受容体から一般式 $(Gal)_n-R$ (但しGalはガラクトース残基、 n は1~4の整数、 R は糖、糖アルコール、スクレオシド、アルコール及びその誘導体をそれぞれ表わす) で示されるガラクトース転移生成物を生成する能力を有する微生物を乳糖または α -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド等、ガラクトース供与体と糖、糖アルコール、スクレオシド、アルコール及びその誘導体等のガラクトース受容体に作用せしめ生成するガラクトース転移生成物を採取することを特徴とするガラクトース転移生成物の製造方法。

2) ガラクトース転移生成物を生成する能力を

有する微生物が、ロドトルラ属、ステリグマトマイセス属、クリプトコッカス属、ゲオトリカム属、アビオトリカム属、コリネバクテリウム属、パチラス属、フラボバクテリウム属、リゾビウム属、シロバシディウム属に属する微生物であることを特徴とする第1請求項記載の製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は乳糖または α -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド等、ガラクトース供与体と糖、糖アルコール、スクレオシド、アルコール及びその誘導体等のガラクトース受容体から一般式 $(Gal)_n-R$ (但しGalはガラクトース残基、 n は1~4の整数、 R は糖、糖アルコール、スクレオシド、アルコール及びその誘導体をそれぞれ表わす) で示されるガラクトース転移生成物の製造法に関する。

近年、ガラクトース残基を含む化合物は糖への転移生成物としてはビフィズス菌の増殖因子として注目されており、その他糖アルコール、スクレ

オシド、アルコール等への転移生成物は溶解度の増加等物性変化が認められ医薬品への応用等々をわめて利用価値が高い。

(従来技術と問題点)

ガラクトース転移生成物を生成させる方法としては、大腸菌の β -ガラクトシダーゼを用いてガラクトース残基をフルクトースあるいはN-アセチルグルコサミンに転移させる方法(Biotechnology Letters 9巻243ページ(1987年))及びアデノシン等スクレオシドに転移させる方法(日本農芸化学会誌 48巻605ページ(1979年))が知られているが、転移生成物の収率は低いという欠点を有している。

(問題を解決するための手段)

本発明者らは上述の事情に鑑み、乳糖または α -ニトロフェニル β -D-ガラクトピラノシド等、ガラクトース供与体と糖、糖アルコール、スクレオシド、アルコール及びその誘導体等のガラクトース受容体からガラクトース転移生成物を高蓄積・高収率で生成する微生物を検索した結果、

ミシガネンス(*Corynebacterium michiganense*) ATCC 492, パチラス メガテリウム(*Bacillus megaterium*) AJ 1272 (FERMP-3747), フラボバクテリウム オーランテアナム(*Flavobacterium aurantium*) AJ 2462 (FERMP-10069), リゾビウム メリロティ(*Rhizobium meliloti*) AJ 2823 (FERMP-8197), シロバシディウム マグナム(*Sirobasidium magnum*) CBC 6803 がある。

これらの微生物の培養には、通常これらの微生物が質化する栄養源であれば何んでも使用しうる。例えばグルコース、シュクロース等の炭水化物、エタノール、グリセロール等のアルコール、酢酸、プロピオン酸等の有機物；大豆油等の炭素源またはこれらの混合物、酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーン、ステイアブリカー、硫酸、アンモニア等の含窒素無機有機栄養源；リン酸塩、マグネシウム、鉄、マンガン、カリ等の無機栄養源；およびビオチン、チアミン等のビタミン類を適宜配合した通常の培地が用いられる。培養の方法としては栄養培地のpHを4.0~9.5の範囲で好

ロドトルラ属、ステリグマトマイセス属、クリプトコッカス属、ゲオトリカム属、アピオトリカム属、コリネバクテリウム属、パチラス属、^{フラボ}バクテリウム属、リゾビウム属、シロバシディウム属に属する微生物が、乳糖または α -ニトロフェニル β -D-ガラクトピラノシド等、ガラクトース供与体と糖、糖アルコール、スクレオシド、アルコール及びその誘導体等のガラクトース受容体から高蓄積・高収率でガラクトース転移生成物を生成することを見だし、本発明を完成させるに至った。

本発明において使用される微生物は具体的にはロドトルラ ミヌタ(*Rhodotorula minuta*) IPO 879, ステリグマトマイセス エリビアエ(*Stenigmatomyces elviae*) AJ 14199 (FERMP-10001), クリプトコッカス ローレンティ(*Cryptococcus laurentii*) IPO 609, ゲオトリカム アミセリカム(*Geotrichum amycelicum*) AJ 14196 (FERMP-10071), アピオトリカム フミコーラ(*Apiotrichum humicola*) ATCC 14438, コリネバクテリウム

気的に20~40℃の範囲で12時間~5日間培養する。

ガラクトース転移生成物を生産させる方法としては培養初期あるいは培養途中に、乳糖または α -ニトロフェニル β -D-ガラクトピラノシド等ガラクトース供与体と糖、糖アルコール、スクレオシド、アルコール及びその誘導体等のガラクトース受容体を培地に添加し、培養しながら行なってもよいし静止菌体を用いてもよい。

静止菌体を用いる方法としては、培養液をそのまま用いる方法、遠心分離等により菌体を分離しこれをリン酸緩衝液等に再懸濁したものに、乳糖または乳糖含有物を添加し反応させる方法等がある。また菌体は生菌体のままでもよいしアセトン処理、凍結乾燥等の処理をほどこしたものでよい。またこれらの菌体を担当に固体化して用いることもできる。

なお、乳糖または α -ニトロフェニル β -D-ガラクトピラノシド等のガラクトース供与体と糖、糖アルコール、スクレオシド、アルコール及

びその誘導体等のガラクトース受容体からガラクトース転移生成物を生成させる反応において、乳糖または α -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド等のガラクトース供与体及びその糖、糖アルコール、スクレオシド、アルコール及びその誘導体等のガラクトース受容体の使用量は特に制限されないが、乳糖として0.5~70%重量%の範囲、好ましくは1%~30%の重量%であり、 α -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシドとしては0.2~10%重量%の範囲、好ましくは0.5~2%重量%の範囲であり、糖、糖アルコール、スクレオシド、アルコール及びその誘導体としては0.1~50%重量%の範囲、好ましくは1.0~30%重量%の範囲である。反応は通常20~70℃、好ましくは25~65℃の温度でpH2~10、好ましくは3~7の範囲で2時間~10日間行なう。

反応が終了した反応液は必要に応じて固体を分離後イオン交換樹脂、ゲル濾過、活性単吸着などのクロマトグラフィー等にかけることによりガラ

クトース転移生成物を精製できる。

以下、本発明を具体的に実施例にて説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。実施例におけるガラクトース転移生成物の定量は高速液体クロマトグラフィー（ポンプは日立製作所製655型、検出器は昭和電工SE-51、カラムはShodex-S801、溶媒は水）を用い、ピーク面積より求めた。

実施例1

ラクトース1.0g/dℓ, グリセロール1.0g/dℓ, 酵母エキス1.0g/dℓ, ポリペプトン1.0g/dℓ, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g/dℓ, K_2HPO_4 0.3g/dℓ, KH_2PO_4 0.1g/dℓ, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g/dℓ, を含む培地(pH7.0)を500mℓ容フラスコに50mℓ入れ115℃, 15分間殺菌した。これにマルツエキス寒天培地で25℃, 2日間培養した。ロドトルラ ^エミヌク1F0 879, ステリグマトマイセス ^エスリビアエ AJ 14199 (PERMP-10001), クリプトコッカス ローレンティ 1F0 609, ゲオトリカム アミセリカム AJ 14196

(PERMP-10071), アビオトリカム フミコーラ ATCC 14438, シロバシディウム マグナム CBS 6803 並びにブイヨン寒天培地に30℃, 24時間培養した。コリネバクテリウム ミシガネンス ATCC 492, バチラス メガテリウム AJ 1272 (PERMP-3747), フラボバクテリウム オーランテアナム AJ 2462 (PERMP-10069), リゾビウム メリロティ AJ 2823 (PERMP-8197)をそれぞれ一白金耳接種し、30℃で1F0 879, AJ 14199 (PERMP-10001), 1F0 609, AJ 14196 (PERMP-10071), ATCC 14438, CBS 6803の場合には2日間、ATCC 492, AJ 1272 (PERMP-3747), AJ 2462 (PERMP-10069), AJ 2823 (PERMP-8197)の場合には24時間振とう培養した。培養終了後遠心分離により菌体を集め培養液と同量の生理食塩水で一回洗浄し菌体を集めた。

この菌体を乳糖2.5g並びに表-1に示した各糖5gを添加した基質液(50mMリン酸緩衝液中、pH7.0)50mℓに懸濁し50℃で24時間反応させた。反応液中のガラクトース転移生成物の生成量を表-1に示した。

表 - 1

	各糖に対するガラクトース転移生成物の生成量 ($\mu\text{g (g/d)} \times 10^{-4}$ 型) (g/d)													
	ガラクトース	グルコース	マンノース	ガラクトース	グルコース	マンノース	グルコース	マンノース	2-デオキシグルコース	ソルビトール	N-アセチルグルコサミン	フクトース	α -グルコシド	α -グルコシド
ロストル 259 IFO 879	1.7	1.2	1.2	1.4	1.5	1.2	1.0	0.8	0.7	0.9	0.4	0.3	0.5	0.4
エリトサール 259 IFO 879 AJ 14199 (PERMP-10001)	1.8	0	1.3	1.4	1.6	1.2	1.1	0.8	0.8	1.0	0.5	0.2	0.6	0.5
ラクトコッカス ロレンツィ IFO 609	1.2	0	0	0.3	0.4	0	0.3	0	0.2	0.2	0	0.1	0	0
エリトサール 259 IFO 879 AJ 14196 (PERMP-10071)	1.4	0.4	0.9	0.2	0.2	0.2	0	0	0.2	0.3	0	0.1	0	0
アセトバクテリウム フスコ ATCC 14438	1.1	0.3	0.7	0.2	0.2	0	0	0	0.2	0.3	0	0	0	0
シロインゲラ 259 IFO 879 CBS 6003	1.6	0.5	1.3	1.4	1.2	1.1	1.0	0.6	0.5	0.8	0.3	0.3	0.3	0.3
エリトサール 259 IFO 879 ATCC 492	1.0	0.6	0.8	0.2	0.3	0.6	0.8	0	0.3	0.3	0	0.1	0	0
エリトサール 259 IFO 879 AJ 1272 (PERMP-3747)	0.8	0.1	0.3	0.2	0.3	0	0	0	0.2	0.2	0	0	0	0
エリトサール 259 IFO 879 AJ 2462 (PERMP-10066)	0.8	0.4	0.4	0.2	0.3	0.5	0.6	0.1	0.3	0.3	0	0	0	0
エリトサール 259 IFO 879 AJ 2823 (PERMP-8197)	0.8	0.5	0.8	0.2	0.2	0.7	0.7	0.2	0.4	0.3	0	0	0	0

実施例 2

実施例 1 と同様にして菌体を調製し、この菌体を乳糖 2.5 g 並びに表 - 2 にしめした各糖アルコール及びアルコール 5 g を添加した基質液 (50 mM リン酸緩衝液中 pH 7.0) 50 ml に懸濁し、50℃ で 24 時間反応させた。反応液中のガラクトース転移生成物の生成量を表 - 2 にしめした。

以下余白

表 - 2

	各種アルコール、アルコールに対するガラクトース転移生成物の生成量 (総 (g/g)・-R量) (g/dl)				
	イノシトール	ソルビトール	マンニトール	キシリトース	グリセロール
ロドトルラ ミヌダ IFO 879	2.2	2.1	2.3	1.2	0.9
ステリグマトマイセス エリビアエ AJ 14199 (PERMP-10001)	2.4	2.2	2.4	1.3	0.8
クリプトコッカス ローレンティ IFO 609	0.6	0.5	0.5	1.0	0.6
ゲオトリカム アミセリカム AJ 14196 (PERMP-10071)	0.4	0.4	0.5	0.4	0.2
アピオトリカム フミコーラ ATCC 14438	0	0.1	0.1	0.3	0.2
シロバシディウム マグナム CBS 6803	2.0	2.0	2.1	1.0	0.7
コリネバクテリウム ミシガネンス ATCC 492	0.2	0.3	0.2	0.3	0.4
バチラス メガテリウム AJ 1272 (PERMP-3747)	0	0.1	0.1	0.2	0.2
フラボバクテリウム オーランテアナム AJ 2462 (PERMP-10069)	0.2	0.2	0.2	0.3	0.4
リゾビウム メリロティ AJ 2823 (PERMP-8197)	0	0.1	0.2	0.3	0.5

実施例 3

実施例 1 と同様にして菌体を調製し、この菌体を乳糖 0.5 g 並びに表 - 3 にしめした各スクレオシド 1.0 g を添加した基質液 (50 mM リン酸緩衝液中 pH 7.0) 10 ml に懸濁し、50℃で24時間反応させた。反応液中のガラクトース転移生成物の生成量を表 - 3 にしめした。

以下余白

表 - 3

	各ヌクレオシドに対するガラクトース転移生成物の生成量 (μ g/4h) (R量) (g/dg)					
	アデノシン	グアノシン	イノシン	シチジン	ウリジン	2'-デオキシ アデノシン
ロドトルラ ミヌタ IFO 879	1.8	0.3	2.6	2.6	2.6	2.4
ステリグマトマイセス エリビアエ AJ 14199 (FERMP-10001)	1.9	0.2	2.7	2.6	2.5	2.3
クリプトコッカス ローレンティ IFO 609	1.3	0	1.5	1.6	1.5	1.4
ゲオトリカム アミセリカム AJ 14196 (FERMP-10071)	1.2	0.1	0.6	1.0	0.9	0.6
アピオトリカム フニコラ ATCC 14438	0.4	0.2	0.5	0.3	0.3	0.3
シロバシディウム マグナム CBS 6803	1.7	0.1	2.4	2.5	2.4	2.2
コリネバクテリウム ミシガネンス ATCC 492	1.3	0.1	1.0	1.3	1.1	0.4
バチラス メガテリウム AJ 1272 (FERMP-3747)	0.6	0.1	0.5	0.2	0.3	0.2
フラボバクテリウム オーランテアナム AJ 2462 (FERMP-10069)	1.2	0.2	0.8	1.2	1.0	0.6
リゾビウム メリロティ AJ 2823 (FERMP-8197)	1.1	0.2	0.9	1.1	0.8	0.5

実施例 4

実施例 1 と同様にして菌体を調製し、この菌体を α -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド 0.15 g 並びに表-4 にしめした各ヌクレオシド 1.0 g を添加した基質液 (50 mM リン酸緩衝液中 pH 7.0) 10 ml に懸濁し、50℃ で 20 時間反応させた。反応液中のガラクトース転移生成物の生成量を表-4 にしめした。

以下余白

表 - 4

	各ヌクレオシドに対するガラクトース転移生成物の生成量 (総 (g/dl) - R量) (g/dl)					
	アデノシン	グアノシン	イノシン	シチジン	ウリジン	2'-デオキシ アデノシン
ロドトルラ ミスタ IFO 879	0.7	0.2	1.3	1.3	1.3	1.3
ステリグマトマイセス エリビアエ AJ 14199 (FERMP-10001)	0.7	0.2	1.4	1.4	1.4	1.3
クリプトコッカス ローレンティ IFO 609	0.4	0.1	0.8	0.9	0.8	0.2
ゲオトリカム ファミセリカム AJ 14196 (FERMP-10071)	0.4	0.1	0.3	0.5	0.4	0.1
アピオトリカム ファミコーラ ATCC 14438	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2
シロバシディウム マグナム CBS 5803	0.6	0.2	1.2	1.3	1.3	1.3
コリネバクテリウム ミシガネンス ATCC 492	0.6	0.1	0.6	0.5	0.6	0.2
バチラス ノガテリウム AJ 1272 (FERMP-3747)	0.3	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
フラボバクテリウム オーランテアナム AJ 2462 (FERMP-10069)	0.5	0.2	0.4	0.6	0.5	0.3
リゾビウム メリロティ AJ 2823 (FERMP-8197)	0.5	0.1	0.5	0.6	0.4	0.3

実施例 5

実施例 1 と同様にして調製したロドトルラ ミスタ IFO 879 の菌体を乳糖 2.5 g 並びにイノシン 5 g を添加した基質液 (50 mM リン酸緩衝液中 pH 7.0) 50 ml に懸濁し 50℃ で 48 時間反応させた。反応液中のガラクトース転移生成物の生成量を表-5 にしめた。

表-5

イノシンに対するガラクトース転移生成物の 生成量 (g/dl)		
ガラクトース残基数	ガラクトース残基数	ガラクトース残基数
1	2	3 以上
1.4	0.8	0.4

平衡液中 pH 7.0) 50 ml に懸濁し、50℃ で 24 時間反応させた。その結果大豆オリゴ糖へのガラクトース転移生成物が 2.6 g (内スタキオースに転移したもの 2.2 g ラフィノースに転移したものの 0.4 g) 生成した。

特許出願人 味の素株式会社

実施例 6

実施例 1 と同様にして調製したロドトルラ ミスタ IFO 879 の菌体を、乳糖 2.5 g 並びに大豆ホエーより抽出した大豆オリゴ糖 5 g (スタキオース 3.5 g, ラフィノース 0.8 g, シュクロース 0.7 g 含有) を添加した基質液 (50 mM リン酸緩